

## بررسی مشخصات و ساختار نانوسامانه سرم آلبومین گاوی-رسوراترول

هاشم اندیشمند<sup>۱</sup>، لیلا روفه‌گری نژاد<sup>۲</sup>، مهناز طبیبی آذر<sup>۳\*</sup>

۱- کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

\* نویسنده مسئول (Mahnaz\_tabibiazar@yahoo.com)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۲۸

### واژه‌های کلیدی

آلبومین  
رسوراترول  
کمپلکس  
نانوسامانه

### چکیده

حل‌شوندگی کم رسوراترول در آب و حساس‌بودن این ترکیب به اکسیداسیون و ایزومریزاسیون، کاربرد آن را در فرمولاسیون مواد غذایی محدود می‌کند. در این مطالعه تأثیر برهمکنش آلبومین-رسوراترول بر اندازه و بار سامانه، حل‌شوندگی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی رسوراترول مورد بررسی قرار گرفت. اندازه و بار ذرات با دستگاه پراکنش نور لیزر، مورفولوژی ذرات به کمک میکروسکوپ الکترونی، تأثیر تشکیل کمپلکس بر حل‌شوندگی رسوراترول در محیط آبی با روش‌های اسپکتروفتومتری معمولی و فلورسانس و خواص آنتی‌اکسیدانی با روش تعیین مقدار قدرت احیاکنندگی آهن ۳ ظرفیتی اندازه‌گیری شد. نتایج حاکی از آن بود که رسوراترول به نسبت مولی ۱ به ۲/۳ حل شده و محلول شفاف و کلوئیدی پایدار ایجاد می‌کند که متوسط اندازه ذرات آن حدود ۳۰ نانومتر و عدم یکنواختی حدود ۰/۶ می‌باشد و بار الکتریکی آن  $18 \pm 3$  است. در تصویر میکروسکوپ الکترونی، اندازه ذرات کمپلکس آلبومین-رسوراترول بین ۳۰ تا ۵۰ نانومتر و به شکل کروی می‌باشد. نتایج آزمون احیاکنندگی آهن نشان داد که قدرت آنتی‌اکسیدانی رسوراترول در سرم آلبومین با نسبت مولی ۶۰:۶۰، حدود ۵۸ درصد رسوراترول محلول در اتانول بود. بنابراین تشکیل کمپلکس مانع از اکسیداسیون رسوراترول می‌شود که قدمی ضروری در فرمولاسیون غذاهای فراسودمند است.

### مقدمه

عروقی و نیز بیماری‌های سیستم عصبی از جمله آلزایمر منتشر شده است (Smoliga et al., 2011). علی‌رغم تأثیرهای مفید آن بر سلامت انسان، دریافت آن از منابع غذایی طبیعی به دلیل محصوربودن در ماتریکس پیچیده و پایین‌بودن دسترسی زیستی آن محدود شده است (Padro-Davidov & McClement, 2014). استخراج رسوراترول و غنی‌سازی منابع غذایی با هدف افزایش حل‌شوندگی رسوراترول در محیط آبی و نیز جلوگیری از اکسیداسیون<sup>۳</sup> و ایزومریزاسیون<sup>۴</sup> آن

رسوراترول<sup>۳</sup>، ۴ و ۵ تری‌هیدروکسی استیلبن<sup>۱</sup> از گروه ترکیبات پلی‌فنلی غیرفلاونوئیدی می‌باشد که در بسیاری از میوه‌ها از جمله انگور، تمشک، زغال‌اخته و بادام‌زمینی وجود دارد (Vang et al., 2011). رسوراترول<sup>۲</sup> یکی از ترکیبات مورد توجه در پیشگیری و درمان سرطان می‌باشد. علاوه بر آن تحقیق‌های متعددی در خصوص خواص ضددیابتی، ضدچاقی، افزایش طول عمر، جلوگیری از بیماری‌های قلبی و

<sup>3</sup> Oxidation

<sup>4</sup> Isomerization

<sup>1</sup> Trihydroxystilbene

<sup>2</sup> Resveratrol

ظرفیته ۵ آبه و محلول ۲، ۴ و ۶ تری‌پیریدیل تیرازین<sup>۵</sup> از شرکت سیگما-آلدریج آمریکا خریداری شدند. بافر فسفات و اتانول از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. شایان ذکر است که رسوراترول در شرایط دمایی ۱۸- درجه سانتی‌گراد و آلومین در دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

### روش‌ها

برای اندازه‌گیری حل‌شوندگی رسوراترول از روش Higuchi استفاده شد (Higuchi & Connors, 1965). محلول‌های سرم آلومین گاوی در غلظت‌های ۰/۳، ۰/۶، ۰/۹ و ۱ میلی‌مولار در حجم ۳ میلی‌لیتر در بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار تهیه شد و به محلول‌های فوق مقادیر اضافی و مشخص از رسوراترول اضافه شد، تمامی نمونه‌ها با پوشش آلومینیومی پوشانده شد تا از رسوراترول در برابر نور محافظت شود و به مدت ۶۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک در دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا به حل‌شوندگی بیشتر رسوراترول کمک شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ (یونیورسال، ساخت آلمان) با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه قرار گرفت و با کمک کاغذ صافی ۰/۲ میکرون (از جنس استات سلولز، ساخت چین) صاف شد تا رسوراترول حل‌نشده کاملاً جدا شود رسوب در اتانول حل و با تهیه رقت تعیین مقدار شد. برای اسپکتروفتومتری از دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل فراماسیا بیوتک، ساخت انگلیس) سل کوارتز<sup>۶</sup> با عرض ۰/۵ سانتی‌متری و برای رسم منحنی کالیبراسیون از محلول اتانولی رسوراترول در طول موج ۳۱۰ نانومتر استفاده گردید. برای تعیین مقدار حل‌شوندگی رسوراترول به روش اسپکتروفتومتری فلورسانس، نمونه‌هایی از مخلوط آلومین و رسوراترول با غلظت مساوی از سرم آلومین گاوی ۳۰ میکرومولار و رسوراترول با غلظت صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ میکرومولار در بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار و pH=۷/۴ تهیه گردید. شدت فلورسانس سرم آلومین گاوی توسط دستگاه اسپکتروسکوپی فلورسانس (مدل جاسکواف-پی ۷۵۰،

با استفاده از نانو یا میکروذرات بیوپلیمری از پروتئین و یا پلی‌ساکاریدها به‌عنوان یک سامانه حامل برای ترکیبات زیست‌فعال بسیار مورد توجه صنایع غذایی و دارویی بوده است (McClements *et al.*, 2009). تشکیل کمپلکس‌های مولکولی بین مواد بیوپلیمری و مولکول‌های زیست‌فعال می‌تواند به تغییر خواص فیزیکوشیمیایی از جمله افزایش حل‌شوندگی در آب و پایداری آنها منجر شود (Andishmand *et al.*, 2017). در فرمولاسیون چنین ساختارهایی، توجه کامل به ساختار این مولکول‌ها و خواص آنها از نظر مورفولوژی، دانسیته، ضریب شکست، pH، متوسط اندازه و بار الکتریکی ذرات و نیز تعریف دقیق شرایط محیطی که در آن شرایط مولکول‌ها قادر به تشکیل ساختار باشند، اقدام بسیار مهمی است (Acota, 2009). یکی از متداول‌ترین روش‌های تشکیل ذرات بیوپلیمری می‌تواند به‌صورت کمپلکس‌های مولکولی باشد که در آن مولکول‌های لیپوفیل با مولکول‌های بیوپلیمر در یک یا چند منطقه ساختمانی برهم‌کنش داشته باشند. از پروتئین‌های کروی از قبیل بتالاکتوگلوبولین<sup>۱</sup> یا سرم آلومین<sup>۲</sup> برای تشکیل کمپلکس با مولکول‌های زیست‌فعال از جمله اسیدلینولئیک کونژوگه<sup>۳</sup>، دکوزا هگزانویک اسید<sup>۴</sup> و رسوراترول استفاده شده است (Lang *et al.*, 2007; Livney, 2010; Matalanis *et al.*, 2011).

لذا هدف این مطالعه، تعیین حل‌شوندگی رسوراترول در محلول سرم آلومین گاوی، اندازه‌گیری اندازه و بار ذرات، برهم‌کنش رسوراترول با آلومین و نیز بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی رسوراترول در کمپلکس آلومین-رسوراترول می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### مواد

سرم آلومین گاوی با وزن مولکولی ۶۶ کیلودالتون و درجه خلوص ۹۶٪، رسوراترول با وزن مولکولی ۲۲۸ گرم بر مول و درجه خلوص ۹۹٪، سولفات آهن ۳

<sup>1</sup>  $\beta$  lactoglobulin

<sup>2</sup> Albumin

<sup>3</sup> Conjugated Linoleic Acid

<sup>4</sup> Docosaheaxaenoic Acid

<sup>5</sup> Tripyridyltriazine

<sup>6</sup> Quartz cell

میانگین‌های به‌دست‌آمده از آزمایش‌ها، از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده گردید. برای مقایسه میانگین‌ها در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی‌دار شناخته شد از آزمون دانکن استفاده گردید و تمامی مراحل تجزیه‌وتحلیل در سطح معنی‌داری ( $\alpha=0/05$ ) انجام شد.

### نتایج و بحث

شکل (۱-الف) مقدار رسوراترول حل‌شده برحسب غلظت میکرومولار را در محلول سرم آلبومین گاوی نشان می‌دهد. حل‌شوندگی رسوراترول در آب حدود ۵۸ میکروگرم در میلی‌لیتر معادل ۲۵۷ میکرومولار است که این مقادیر در محلول‌های ۰/۳ و ۰/۶ میلی‌مولار از سرم آلبومین به‌ترتیب به ۱۷۱ و ۳۴۶ میکروگرم در میلی‌لیتر معادل ۷۵۴ میکرومولار و ۱/۵۲ میلی‌مولار افزایش می‌یابد. اندازه‌گیری حل‌شوندگی رسوراترول در محلول‌های سرم آلبومین با غلظت‌های متفاوت نشان داد که یک مول آلبومین حدود ۲/۳ مول رسوراترول را در خود حل می‌کند. افزایش حل‌شوندگی رسوراترول در محلول پروتئینی مربوط به تشکیل کمپلکس بین آنهاست (Cao et al., 2009). برهم‌کنش بین پروتئین با لیگاندها به ثابت پیوندی و حلالیت اولیه مولکول در آب ارتباط دارد. مقدار ثابت پیوندی یا ثابت تشکیل کمپلکس به روش Higuchi (۱۹۶۵) طبق رابطه (۱) محاسبه شد. رابطه (۱)

$$Kc = \frac{\text{slope}}{S_0.(1 - \text{slope})}$$

در رابطه (۱) مقدار  $k_c$  برای کمپلکس سرم آلبومین-رسوراترول ۶۷۲۸ بر مول محاسبه شد (Higuchi & Cannors, 1965). این مقدار حل‌شوندگی، از مقادیر به‌دست‌آمده برای کمپلکس رسوراترول-بتا سیکلودکستریز<sup>۱۰</sup> و جی-۲-بتا سیکلودکستریز<sup>۱۱</sup> که تشکیل کمپلکس در آنها به‌صورت فیزیکی است، بالاتر می‌باشد (Lucas et al., 2007). شکل (۱-ب) طیف فلورسانس سرم آلبومین را به تنهایی و در حضور غلظت‌های مختلف از رسوراترول

ساخت ژاپن) با سل‌کوآرتز ۱ سانتی‌متری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. طول موج تهییج ۲۸۰ نانومتر و طول موج نشر روی ۲۹۰ تا ۵۰۰ نانومتر و پهنای باند تهییج و نشر بر ۵ نانومتر تنظیم گردید. طیف‌سنجی فرورسرخ با تبدیل فوریه (FTIR)<sup>۱</sup> در حالت عبور با استفاده از دستگاه (بروکر-تنسور ۲۷، ساخت آلمان) با استفاده از سل‌سلنید روی و تکنیک ای-تی-آر (ATR)<sup>۲</sup> که مناسب برای نمونه‌های مایع آبی می‌باشد، انجام شد. طیف‌سنجی در محدوده  $4000-500 \text{ cm}^{-1}$  و با قدرت تفکیک‌پذیری  $2 \text{ cm}^{-1}$  و تعداد ۱۰۰ اسکن انجام شد. میانگین اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات براساس پراکنش نور لیزر اساس (DLS)<sup>۳</sup> با دستگاه مالورن<sup>۴</sup> (ساخت انگلیس) تعیین شد. برای جلوگیری از اثر مداخله پراکنش نور، نمونه‌ها به میزان ۱۰۰ برابر با آب‌مقطر استریل ۲ بار تقطیر رقیق‌سازی شده و بار سطحی ذرات سامانه نیز با همان دستگاه مالورن بررسی گردید. مورفولوژی ذرات به کمک دستگاه میکروسکوپ الکترونی (SEM)<sup>۵</sup> پایش شد. اثر برهم‌کنش رسوراترول-آلبومین بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی رسوراترول به روش فرآپ<sup>۶</sup> بررسی شد. قدرت احیاکنندگی کمپلکس سرم آلبومین گاوی-رسوراترول در بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار (pH=۷/۴) و رسوراترول در اتانول با روش اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی آهن ۳ ظرفیتی مورد آزمایش قرار گرفت. این روش قدرت یک آنتی‌اکسیدان را در تبدیل آهن ۳ ظرفیتی به آهن ۲ ظرفیتی براساس شدت جذب کمپلکس آبی رنگ آهن ۲ ظرفیتی با محلول ۲، ۴ و ۶ تری‌پیریدیل تیرازین<sup>۷</sup> در طول موج ۵۹۳ نانومتر، اندازه‌گیری می‌کند. برای تهیه منحنی استاندارد از محلول سولفات آهن ۵ به<sup>۸</sup> با غلظت‌های بین ۱۰۰۰-۱۰ میکرومولار استفاده شد. تمامی آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام شده و تجزیه‌وتحلیل داده‌های حاصله با نرم‌افزار گراف‌پد پریسم<sup>۹</sup> انجام گرفت. به‌منظور مقایسه

<sup>1</sup> Fourier transform infrared spectroscopy

<sup>2</sup> Attenuated Total Reflection

<sup>3</sup> Dynamic light scattering

<sup>4</sup> Malvern

<sup>5</sup> Scanning electron microscopy

<sup>6</sup> FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

<sup>7</sup> 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ)

<sup>8</sup> Fe So<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O

<sup>9</sup> GraphPad Prism

<sup>10</sup> Resveratrol-beta-cyclodextrine

<sup>11</sup> Beta-cyclodextrin (g2-beta-cyd)

شکل (۱-ج) می‌توان از معادله خط به‌دست‌آمده برای تعیین حل‌شوندگی رسوراترول در آلومین استفاده کرد. در اندازه‌گیری حل‌شوندگی رسوراترول هم از روش تعیین غلظت مقادیر حل‌نشده، به روش اسپکتروفترومتری استفاده شد و هم غلظت رسوراترول حل‌شده از طریق نمودار استرن ولمر و براساس نتایج اسپکتروفترومتری فلورسانس تعیین شد که نتایج حاصل از دو روش هم‌خوانی داشتند. لازم به ذکر است که در مطالعه‌های مشابه، حل‌شوندگی رسوراترول در تشکیل کمپلکس‌های شیمیایی با پروتئین‌ها مورد اندازه‌گیری قرار نگرفته بود (Liang et al., 2007; Bourassa et al., 2010).

طیف فلورسانس همگام<sup>۲</sup> سرم آلومین برای اسیدآمینه تیروزین<sup>۳</sup> و تریپتوفان<sup>۴</sup> در شکل (۲ الف و ب) نشان داده شده است. با تنظیم  $\Delta\lambda$  به ترتیب روی ۶۰ و ۱۵ نانومتر و ثبت طیف فلورسانس همگام محلول‌های حاوی آلومین و رسوراترول می‌توانیم اطلاعات در مورد تریپتوفان و تیروزین موجود در آلومین به‌دست بیاوریم. فلورسانس آلومین مربوط به حضور ۳ اسیدآمینه با خاصیت فلورسانس شامل تریپتوفان ۱۳۴ و ۲۱۲ و تیروزین است (Cao et al., 2009). تغییر در طول موج ماکزیمم نثری بیانگر آن است که رسوراترول در محیط اطراف تیروزین و تریپتوفان تأثیر گذاشته است. به‌عنوان مثال در  $\Delta\lambda=60\text{nm}$  شیف آب طول موج ماکزیمم نثری نشان‌دهنده آن است که ساختار آلومین تغییر یافته و قطبیت اطراف تریپتوفان کاهش یافته و آب‌گریزی افزایش یافته است. بنابراین برهم‌کنش رسوراترول و آلومین باعث تغییرات فضایی و تغییر قطبیت در ساختار آلومین شده است و این مهم در برهم‌کنش‌های آب‌گریز و تشکیل کمپلکس نقش مهمی ایفا می‌کند (Chen et al., 2016). این نتایج با نتایج مطالعه‌های پیشین مبنی بر تشکیل کمپلکس بین رسوراترول و پروتئین‌های متعدد از جمله سرم آلومین و پروتئین‌های آب‌پنیر مطابقت دارد (Liang et al., 2007; Lu et al., 2008; Xiao et al., 2008).

نشان می‌دهد. شدت فلورسانس سرم آلومین به‌طور منظم و معنی‌داری با افزایش غلظت رسوراترول کاهش می‌یابد و هم‌زمان طول موج ماکزیمم جذب به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. داده‌های مربوط به کاهش شدت فلورسانس یک ترکیب در شرایط ثابت دمایی، pH و قدرت یونی براساس معادله استرن ولمر (رابطه ۲) آنالیز می‌شود.

رابطه (۲)

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q]$$

در رابطه (۲)،  $F_0$  و  $F$ ، به ترتیب، شدت فلورسانس آلومین در غیاب و در حضور خاموش‌کننده می‌باشد،  $K_{SV}$  ضریب خاموشی استرن ولمر<sup>۱</sup> (لیتر بر مول) است.  $[Q]$  غلظت خاموش‌کننده (مول بر لیتر) و  $k_q$  ثابت سرعت خاموش‌سازی (لیتر بر مول ثانیه) است که می‌تواند به‌صورت رابطه (۳) نوشته شود.

رابطه (۳)

$$K_{SV} = K_q\tau_0$$

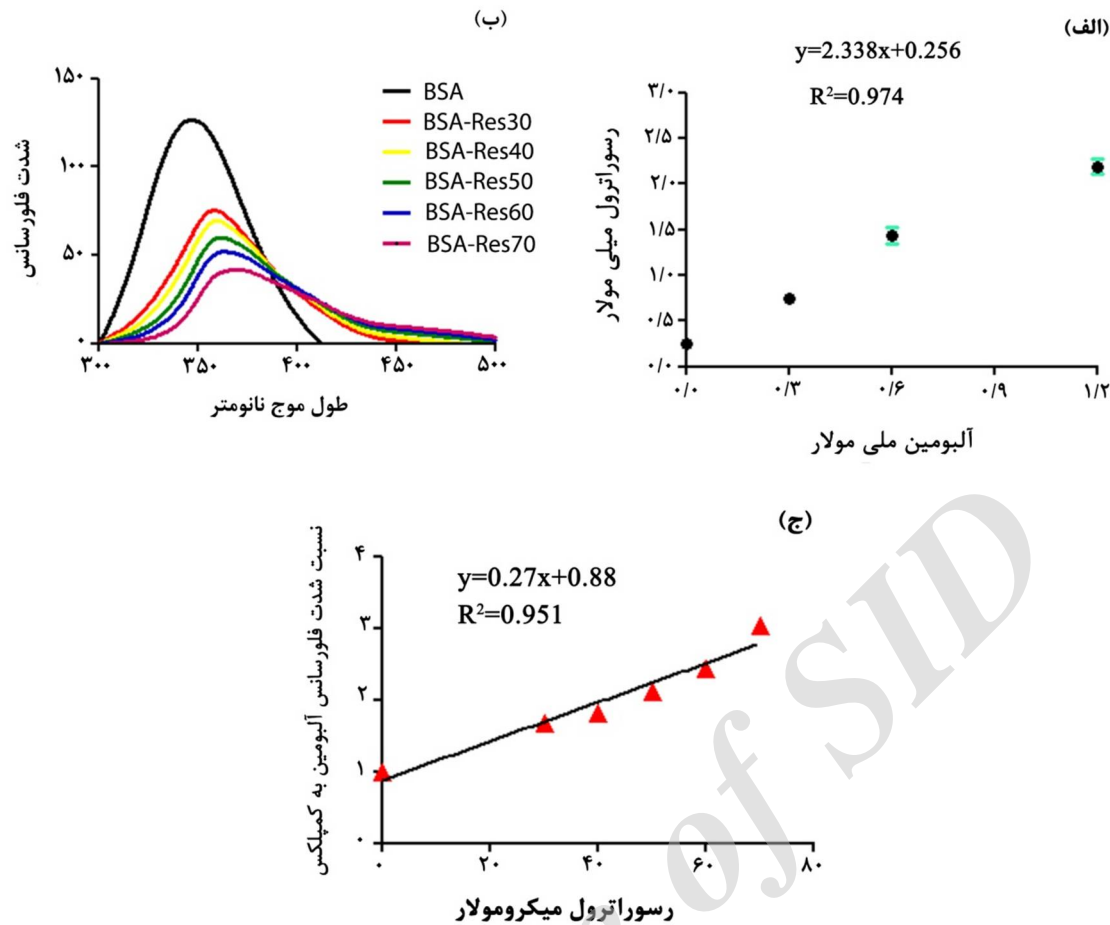
به‌طوری‌که در رابطه (۳)،  $\tau_0$  طول عمر متوسط آلومین بدون خاموش‌کننده و معمولاً برابر با  $10^{-8}$  ثانیه می‌باشد. مقدار ثابت استرن ولمر برای برهم‌کنش رسوراترول با سرم آلومین در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد  $K_{SV}=2/88 \times 10^4$  است. با جاگذاری در رابطه (۳)، مقدار  $K_q$  بسیار بیشتر از حداکثر پراکندگی ثابت خاموشی برخوردی ۲ مولکول (ثانیه بر مولار  $K_q=2 \times 10^{10}$ ) می‌باشد که نشات‌دهنده شرایط استاتیک در محیط واکنش است که با نتایج مطالعه‌های قبلی مطابقت دارد (Bourassa et al., 2010). Wei و همکاران (۲۰۱۰) با استفاده از منحنی رگرسیون دبل لگاریتمی تشکیل کمپلکس سرم آلومین-رسوراترول را بررسی کردند و پارامترهای ثابت پیوندی و تعداد سایت‌های پیوندی بیمن آلومین و رسوراترول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد (Wei et al., 2010) اگر نسبت شدت فلورسانس آلومین در غلظت‌های مختلف از رسوراترول برحسب غلظت رسوراترول رسم شود (نمودار استرن ولمر)

<sup>2</sup> Synchronous Fluorescence

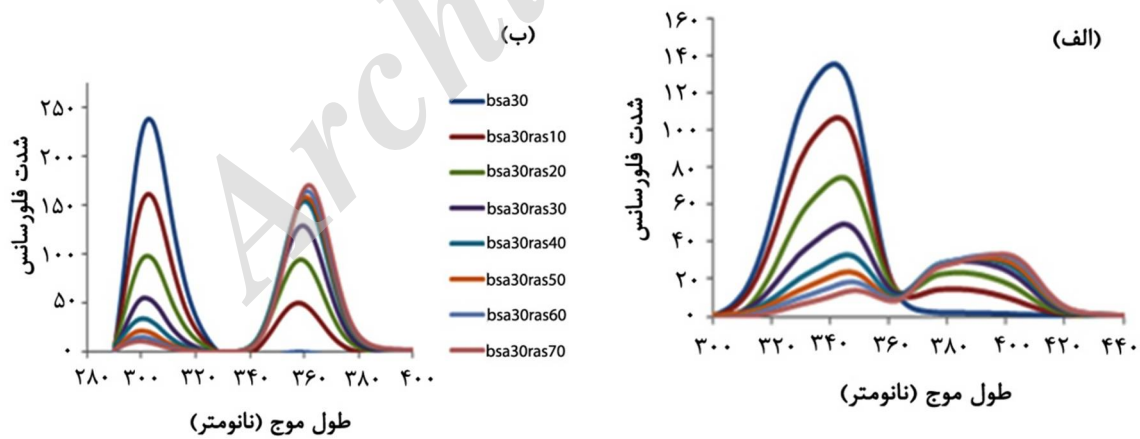
<sup>3</sup> Tyrosine

<sup>4</sup> Tryptophan

<sup>1</sup> Stern-volmer



شکل ۱- تعیین حل شونده رسوراترول از طریق اسپکتروفتومتری و مقدار رسوراترول حل نشده (الف)، نمودار استرن ولمرن (ب) بررسی تشکیل کمپلکس و مقدار رسوراترول حل شده از طریق اسپکتروفتومتری فلورسانس و کاهش فلورسانس آلبومین در غلظت‌های بالاتر رسوراترول (ج)



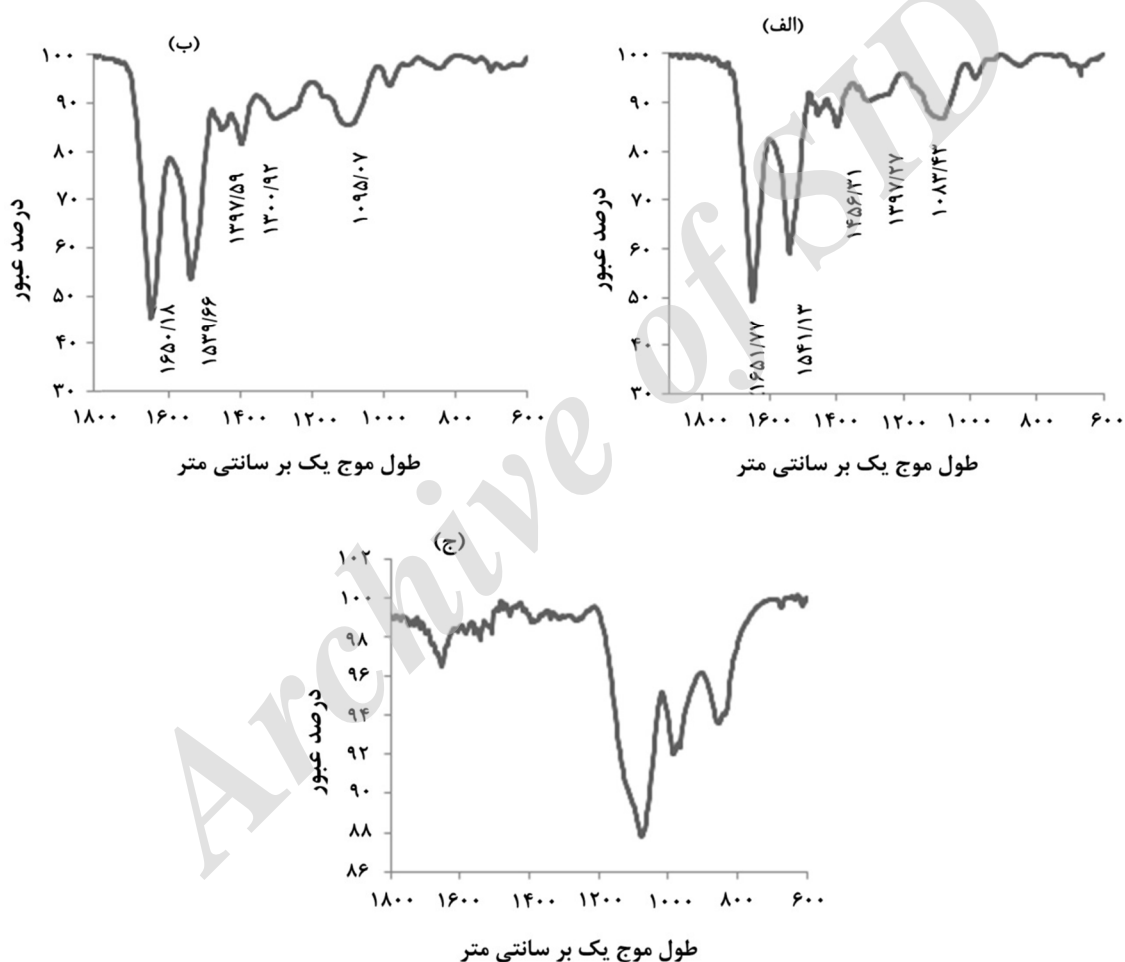
شکل ۲- بررسی طیف سینکرونایس فلورسانس سرم آلبومین اسید آمینه تریپتوفان ۶۰ و تیزوزین ۱۵

بررسی اولیه طیف تغییر محسوسی در نواحی ساختاری محلول پروتئین با محلول پروتئین رسوراترول در محل‌های مربوط به آمید ۱، طول موج ۱۶۵۱ (پیوندهای C=O) و آمید ۲ طول موج ۱۵۴۱

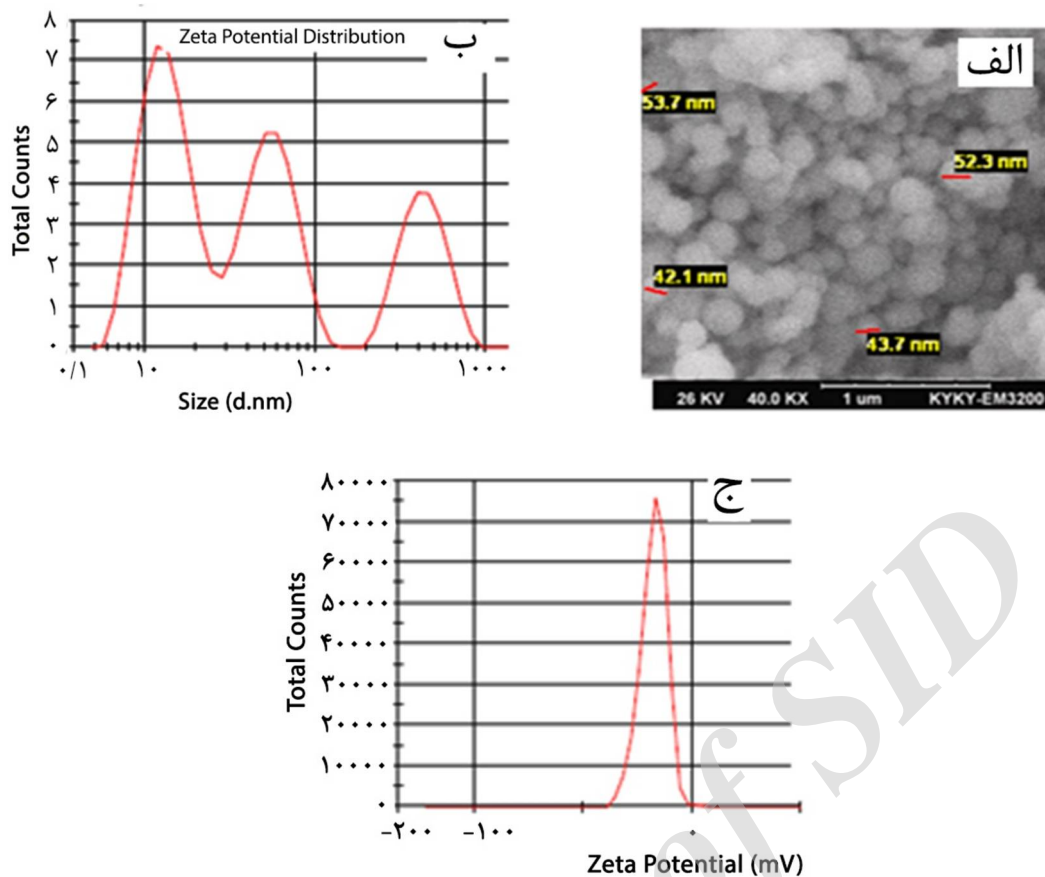
شکل (۳-الف و ۳-ب) به ترتیب طیف ATR-FTIR محلول آلبومین در بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار pH=7/4 و کمپلکس سرم آلبومین-رسوراترول را با غلظت مولی ۳۰۰:۳۰۰ میکرومولار نشان می‌دهد. در

آلبومین-رسوراترول در شکل (۴-الف) نشان داده شده است. شکل (۴-ب و ۴-ج) به ترتیب اندازه ذرات کمپلکس آلبومین با رسوراترول و بار آن (۱۸- میلی‌ولت) را نشان می‌دهد. هرچند که کمپلکس کلوییدی حدود بیش از ۳ ماه در دمای یخچال پایدار بود، در بررسی اندازه و بار ذرات عدم یکنواختی در اندازه ذرات مشاهده شد. علت عدم یکنواختی در اندازه ذرات می‌تواند مربوط به حضور و تشکیل دimer و مونومر پروتئین آلبومین باشد (Navarra *et al.*, 2016).

(پیوندهای C-N و N-H) مشاهده نشد. برای بررسی بیشتر، تفاوت شدت نوسانات کمپلکس آلبومین-رسوراترول با محلول پروتئینی سرم آلبومین رسم شد (شکل ۳-ج). کاهش در شدت نوسانات در محل آمید ۱ (۱۶۵۱) و آمید ۲ (۱۵۴۱) نشان‌دهنده کاهش شدید ساختار آلفاهلیکس پروتئین سرم آلبومین است لذا در غلظت مورد بررسی، برهم‌کنش بین سرم آلبومین با رسوراترول باعث ایجاد تغییر در ساختار پروتئین شده است (Jiang *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2009). تصویر میکروسکوب الکترونی کمپلکس



شکل ۳- طیف (ATR-FTIR) محلول سرم آلبومین با غلظت ۳۰۰ میکرومولار (الف)، کمپلکس آلبومین-رسوراترول ۳۰۰:۳۰۰ میکرومولار (ب)، تفاوت شدت طیف کمپلکس با طیف سرم آلبومین (ج)



شکل ۴ - تصویر میکروسکوپ الکترونی کمپلکس آلبومین-رسوراترول (الف) و اندازه ذرات محلول آلبومین رسوراترول براساس شدت نوسانات نور لیزر (ب) و مقدار پتانسیل زتا (ج)

کم محیط آزمون، به آرامی صورت می‌گیرد و باید زمان آزمون افزایش داده شود تا فرصت بروز پیدا کنند (Benzie & Strain, 1996)، بنابراین نتایج این مطالعه براساس زمان ۶۰ دقیقه آنالیز شد. نتایج نشان داد که کمپلکس شدن می‌تواند بین ۶۰ تا ۳۰ درصد از خاصیت آنتی‌اکسیدانی رسوراترول محافظت کند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی معادل تورولاکس<sup>۱</sup> برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاتچین-آلبومین گزارش شده است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی کمپلکس کاتچین-آلبومین نسبت به کاتچین آزاد تا حدود ۲۱ درصد کاهش یافته بود (Arts *et al.*, 2002)

جدول (۱) نتایج اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی رسوراترول در محلول آبی، اتانولی و کمپلکس آن در محلول سرم آلبومین گاوی را نشان می‌دهد. مطابق جدول (۱) قدرت آنتی‌اکسیدانی محلول ۶۰ میکرومولار رسوراترول در سرم آلبومین با نسبت مولی ۶۰:۶۰ نسبت به محلول رسوراترول در اتانول کاهش معنی‌داری داشت و حدود ۵۸ درصد از مقدار عدد فراپ کاسته شد. اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی یک ترکیب براساس نقل‌وانتقال الکترون در روش فراپ به زمان آنالیز، نوع حلال‌های مورد استفاده و نیز نوع ترکیب بستگی دارد (Pioral *et al.*, 2005). برخی از پلی‌فنل‌ها از جمله رسوراترول به آرامی با محلول فراپ واکنش می‌دهد و نیاز به زمان بیشتری برای انجام واکنش دارند (Oual *et al.*, 2002). علاوه بر آن در روش فراپ، فعالیت ترکیباتی که دارای گروه‌های تیول و پروتئینی هستند به علت pH

<sup>۱</sup> Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

جدول ۱-مقادیر اعداد فراب برای غلظت‌های مختلف رسوراترول در محلول آبی، اتانولی و آلومینی پس از ۴ و ۶۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برحسب میکرو مولار آهن ۲ ظرفیتی

زمان (دقیقه)	محلول آبی		محلول الکی		محلول سرم آلومین	
	۴	۶۰	۴	۶۰	۱:۲	۱:۱
غلظت رسوراترول	۴	۶۰	۴	۶۰	۴	۶۰
۳۰	۳۵/۵±۱/۵	۵۴/۵±۲/۱ <sup>a</sup>	۳۰/۳±۳/۵	۵۶/۵±۰/۷ <sup>a</sup>	۱۵/۵±۰/۲	۲۴/۱±۰/۵ <sup>b</sup>
۶۰	۷۴/۵±۳/۱	۱۰۶/۳±۱/۵ <sup>a</sup>	۶۰/۵±۰/۱	۹۹/۵±۱/۲	۳۸/۵±۰/۵	۵۸/۳±۱/۰
۹۰	۱۱۸/۲±۳/۵	۱۷۹/۱±۵/۵ <sup>a</sup>	۱۰۲/۲±۲/۵	۱۵۷/۵±۳/۲ <sup>a</sup>	۶۴/۴±۰/۷	۹۶/۵±۱/۰ <sup>b</sup>

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در ستون‌ها می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

### نتیجه‌گیری

آنتی‌اکسیدانی رسوراترول در محیط‌های آبی که یک اقدام اولیه و ضروری برای طراحی انواع غذاهای فراسودمند محسوب می‌شود، نقش مهم داشته باشد.

به نظر می‌رسد یافته‌های این مطالعه در افزایش حل‌شوندگی، پایداری کلونیدی و حفظ خواص

### منابع

- Acosta, E. 2009. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14(1): 3-15.
- Andishmand, H., Tabibiazar, M., Mohammadifar, M.A., & Hamishekar, H. 2017 Pectin-Zinc-chitosan-polyethylene glycol colloidal nano-suspension as a food grade carrier for colon targeted delivery of resveratrol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97: 16-22.
- Arts, M.J., Haenen, G.R., Wilms, L.C., Beetstra, S.A., Heijnen, C.G., Voss, H.-P., & Bast, A. 2002. Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry* 50(5): 1184-1187.
- Benzie, I.F., & Strain, J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power: the FRAP assay". *Analytical biochemistry*, 239(1): 70-76.
- Bourassa, P., Kanakis, C., Tarantilis, P., Pollissiou, M., & Tajmir-Riahi H. 2010. Resveratrol, Genistein, and Curcumin Bind Bovine Serum Albumin†. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(9):3348-54.
- Cao, S., Wang, D., Tan, X., & Chen, J. 2009. Interaction between trans-resveratrol and serum albumin in aqueous solution. *Journal of solution chemistry*, 38(9):1193-202.
- Chen, Y.C., Wang, H.M., Niu, Q.X., Ye, D.Y., & Liang, G.W. 2016. Binding between Saikosaponin C and Human Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy and Molecular Docking. *Molecules*, 21(2), 153.
- Davidov-Pardo, G., & McClements, D.J. 2001. Resveratrol encapsulation: designing delivery systems to overcome
- Higuchi, T. & Connors, K.A. 1965 Phase-solubility techniques. *Adv Anal Chem Instrum*, 4(2):117-212.
- Jiang, X.Y., Li, W.X., & Cao, H. 2008. Study of the interaction between trans-resveratrol and BSA by the multi-spectroscopic method. *Journal of solution chemistry*, 37(11):1609-23.
- Liang, L., Tajmir-Riahi, H. & Subirade, M. 2007. Interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with resveratrol and its biological implications. *Bio macromolecules*, 9(1): 50-56.
- Livney, Y. D. 2010. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1): 73-83.



- 13-Lu, Z., Zhang, Y., Liu, H., Yuan, J., Zheng, Z. & Zou, G. 2007 Transport of a cancer chemopreventive polyphenol, resveratrol: interaction with serum albumin and hemoglobin. *Journal of fluorescence*, 17(5):580-7.
- 14-Lucas-Abellán, C., Mercader-Ros, M., Zafrilla, M., Fortea, M., Gabaldón, J. & Núñez-Delicado, E. 2008. ORAC-fluorescein assay to determine the oxygen radical absorbance capacity of resveratrol complexed in cyclodextrins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(6):2254-9.
- 15-Lucas-Abellán, C., Fortea, I., López-Nicolás, J. M. & Núñez-Delicado, E. 2007. Cyclodextrins as resveratrol carrier system. *Food chemistry*, 104(1): 39-44.
- 16-Matalanis, A., Jones, O.G., & McClements, D.J. 2011. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, 25(8): 1865-1880.
- 17-McClements, D.J., Decker, E.A., Park, Y., & Weiss, J. 2009. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(6): 577-606.
- 18-Navarra, G., Peres, C., Contardi, M., Picone, P., San Biagio, P.L., Di Carlo, M., Giacomazza, D., & Militello, V. 2016. Heat-and pH-induced BSA conformational changes, hydrogel formation and application as 3D cell scaffold. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 606: 134-142.
- 19-Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., & Deemer, E.K. 2002 .Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11): 3122-3128.
- 20-Prior, R.L., Wu, X., & Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10): 4290-4302.
- 21-Smoliga, J. M., Baur, J. A. & Hausenblas, H. A. 2011. Resveratrol and health—a comprehensive review of human clinical trials. *Molecular nutrition & food research*, 55(8): 1129-1141.
- 22-Vang, O., Ahmad, N., Baile, C.A., Baur, J.A., Brown, K., Csiszar, A., Das, D.K., Delmas, D., Gottfried, C., & Lin, H.-Y. 2011. What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *Public Library of Science One*, 6(6): e19881.
- 23-Wei, X.L., Xiao, J.B., Wang, Y., & Bai, Y. 2010. Which model based on fluorescence quenching is suitable to study the interaction between trans-resveratrol and BSA? *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 75(1):299-304.
- 24-Xiao, J., Chen, X., Jiang, X., Hilczer, M., & Tachiya, M. 2008. Probing the interaction of trans-resveratrol with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study with Tachiya model. *Journal of fluorescence*, 18(3-4):671-8.

## Nanostructure Characterization of Bovine Serum Albumin-resveratrol Complex

Hashem Andishmand<sup>1</sup>, Leila Roufegari-nejad<sup>2</sup>, MahnazTabibiazar<sup>3\*</sup>

- 1- Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition and Food Science, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
- 2- Assistant Professor in Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Azad University, Tabriz branch, Tabriz, Iran
- 3- Assistant Professor in Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition and Food Science, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

\* Corresponding author (mahnaz\_tabibiazar@yahoo.com)

### Abstract

Low solubility, oxidation and isomerization of resveratrol limit its application in food formulation. In this study the effect of bovine serum albumin (BSA) -resveratrol interaction on droplet size and Zeta potential of complex, solubility and antioxidant activity of resveratrol was investigated. Droplet size, Zeta potential and morphology of nanoparticles were analyzed using dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscopy (SEM). Complex formation and solubility of resveratrol were measured using spectrophotometric techniques. Antioxidant activity was measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. The results indicated that resveratrol was solubilized in BSA solution at a 2.3:1 molar ratio as a colloidal stable solution with droplet diameter of about 30 nm and PDI<0.6 and Zeta potential  $-18\pm 3$ . In SEM image the nanoparticles were seen as globular particle with sizes between 30-50 nm. The result of FRAP showed that the antioxidant activity of BSA-resveratrol complexes in the molar ratio of (60:60) was nearly 58% of antioxidant activity of equivalent amounts of resveratrol in ethanol. Therefore, formation of the complexes protects resveratrol from rapid oxidation that is an essential step in functional food formulation.

**Keywords:** Albumin, Complex, Nano system, Resveratrol